

**Avaliação e caracterização de potenciais
antagonistas de *Sclerotium rolfsii*
pertencentes ao gênero *Trichoderma***

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 165

***Avaliação e caracterização de
potenciais antagonistas de *Sclerotium
rolfsii* pertencentes ao gênero
*Trichoderma****

Raquel Rocha de Pádua
Danillo Oliveira de Alvarenga
Paulo Roberto Queiroz
Sueli Corrêa Marques de Mello

*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília – DF
2007*

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-
3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 945 Avaliação e caracterização de potenciais antagonistas de *Sclerotium rolfsii* pertencentes ao gênero *Trichoderma* / Raquel Rocha de Pádua ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
23 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 165).

1. *Trichoderma* - agentes de biocontrole - *Sclerotium rolfsii*. I. Pádua, Raquel Rocha de. II. Série.

579.5677 - CDD 21.

Avaliação e caracterização de potenciais antagonistas de *Sclerotium rolsii* pertencentes ao gênero *Trichoderma*

Raquel Rocha de Pádua¹

Danillo Oliveira de Alvarenga²

Paulo Roberto Queiroz³

Sueli Corrêa Marques de Mello⁴

RESUMO

Sclerotium rolsii constitui um sério problema agrícola, causando várias doenças como podridão do colo e tombamento de plântulas do feijoeiro e de outras espécies de importância econômica. Este trabalho foi conduzido com os objetivos de verificar o potencial de isolados de *Trichoderma* como agentes de biocontrole do patógeno e caracterizar dois isolados do antagonista, usando os critérios de resistência a fungicida, produção de conídios em meio de cultura e capacidade de produção de enzimas hidrolíticas envolvidas no micoparasitismo por estes isolados. Dentre os isolados estudados, CEN 201 foi o que apresentou maior potencial de biocontrole contra o patógeno nos ensaios conduzidos em casa de vegetação, o que não foi relacionado a uma maior capacidade de esporulação em meio de batata-dextrose-ágar. No tocante à atividade enzimática, detectou-se pouca habilidade deste isolado para a produção de quitinase e N-acetilglicosaminidase. Por outro lado, o isolado CEN 241, de menor potencial antagonista, apresentou elevada capacidade de esporulação no mesmo meio e grande habilidade para produção enzimática. Estes dados contrariam informações da literatura, que sugerem correlação da atividade enzimática em filtrado de cultura com o potencial antagonístico.

¹ Bióloga, graduanda, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

² Biólogo, graduando, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

³ Biólogo, Ph.D., Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

⁴ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

ABSTRACT

Sclerotium rolfsii is a serious agricultural problem, causing several diseases as the stem rot and damping off of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and others economic species. This work was carried out with the objective to verify the potential of *Trichoderma* isolates as biocontrol agents for the stem rot and damping off of seedling of bean and characterize selected antagonistic isolates using criteria of resistance to pesticides, conidia production in culture medium and production of hydrolytic enzymes involved in mycoparasitism. Among the isolates studied, CEN 201 isolate presented more biocontrol potential against the pathogen in the experiments conducted in greenhouse conditions. However, it did not present more capability of sporulation on potato-dextrose-agar medium. In relation to the enzymatic activity, it was not detected a high ability of this isolate in the production of chitinase and N-acetylglucosaminidase. These data contest information found in literature that indicate correlation between enzyme activity in culture filtrate and antagonistic potential.

INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) está entre os alimentos mais consumidos por habitantes da América Latina. Em nosso país, a importância social e econômica desta leguminosa deve-se, principalmente, ao fato de constituir-se uma fonte barata de proteínas e calorias na dieta de pessoas com baixo poder aquisitivo. O plantio de feijão no Brasil é feito ao longo do ano, em três épocas, de tal forma que, em qualquer mês, sempre haverá produção de feijão em algum ponto do país, o que contribui para o abastecimento interno (YOKOYAMA, 2006).

Conforme a população humana aumenta, cresce paralelamente a demanda por alimentos. Para satisfazer essa necessidade não basta apenas aumentar a área cultivada, mas principalmente a produtividade. Considerando que as plantas cultivadas representam a principal fonte nutricional do homem, tem-se reduzido a diversidade de espécies de plantas dando lugar ao cultivo de uma só espécie produtora de alimentos. Sendo assim, quanto maior for a população de uma espécie e maior for sua área cultivada, maior é o risco de ocorrência de epidemias de doenças de plantas (REIS et al., 2001), e enfrentando esse problema é que os agricultores aumentam a quantidade de aplicações ou concentrações de pesticidas na cultura, resultando em altos rendimentos nas colheitas. Entretanto, este desequilíbrio ambiental prejudica a vida selvagem e os organismos não patogênicos e benéficos, e os efeitos residuais tóxicos causados pelo uso contínuo destes produtos químicos nocivos estão impondo um aumento de pressão seletiva no ambiente e, conseqüentemente, selecionando formas resistentes de organismos fitopatogênicos. Há também a intoxicação humana, contaminação de alimentos, cadeia alimentar comprometida e contaminação dos reservatórios de água e solos (JACK et al., 1991).

Portanto, uma das alternativas para o controle de fitopatógenos é a utilização de agentes biológicos, pois a preocupação com o meio ambiente bastante afetado pelo uso de agrotóxicos resultou em nova perspectiva para o manejo de pragas e doenças na área agrícola. Enquanto os fungicidas têm somente um efeito temporário e usualmente necessitam aplicações repetidas durante o período de crescimento da lavoura, os agentes de controle biológico são capazes de se estabelecer no ecossistema, reproduzir, colonizar rizosfera, espermosfera, filosfera e rizoplane. Além disso, as estratégias de controle biológico são altamente compatíveis com as práticas de agriculturas autosustentáveis que são necessárias para a conservação dos recursos naturais para a agricultura (SIVAN e CHET, 1992).

O controle biológico pode ser definido como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença por meio de um ou mais organismos” (FRITZ, 1996). O controle aplicado por meio da introdução e manipulação de inimigos naturais pelo homem pode ser utilizado em combinação com outro método, biológico ou químico, sendo que neste a dosagem será reduzida devido à eficiência dos antagonistas e, com isso há grandes benefícios ao meio ambiente (MELO, 1991). Este método é conhecido como manejo integrado de pragas (MIP), e os conceitos iniciais para esta prática provêm dos anos 50 (BECKER e SCHWINN, 1993; LIMA, 1997), como por exemplo, o trabalho apresentado por Pereira et al. (1996), no qual se concluiu que a utilização de *Trichoderma harzianum* Rifai juntamente a um vermicomposto associado ao herbicida EPTC é uma estratégia promissora para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary.

Os fungos do gênero *Trichoderma* vêm sendo utilizados com sucesso no controle de várias doenças de plantas, dentre as quais as podridões de raiz e colo causadas por *Sclerotium rolfii* Sacc. (PAPAVIZAS, 1985). O antagonismo ocorre em resposta a estímulos químicos liberados pelo hospedeiro (CHET, 1992). Os mecanismos utilizados por *Trichoderma* são: a) produção de antibióticos, quando os metabólitos produzidos pelo antagonista destroem o organismo, com os fungos antagonistas produzindo algumas substâncias antibióticas que inibem o crescimento normal do patógeno no solo (DENIS e WEBSTER, 1971a, b) competição, a interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação, ocorrendo principalmente por alimentos, por espaço e por oxigênio (SCHIPPERS et al., 1987; WELLER, 1988); c) micoparasitismo, fenômeno em que determinado microrganismo obtém nutrientes a partir das células vivas e funcionais do hospedeiro com quem vive em íntima associação. Ele pode fazer isso matando as células daquele para depois se alimentar (parasita necrotrófico) ou absorvendo nutrientes das células vivas (parasita biotrófico), tendo-se então as etapas de quimiotropismo, reconhecimento do patógeno, secreção de enzimas hidrolíticas e, finalmente, lise celular.

A etapa de reconhecimento foi constatada pela técnica de fios de náilon por Dennis e Webster (1971c) onde foram usados fios de náilon com diâmetro similar a hifa de *Pythium ultimum* Trow e cobertos por uma lectina específica. Com esse experimento concluiu-se que o micoparasita cresce paralelamente ou dando voltas no hospedeiro. Utilizando essa mesma técnica, porém com um fio de náilon coberto por lectina purificada de *Sclerotium rolfii*, Inbar e Chet (1992; 1994) determinaram que a lectina (glicoproteína que aglutina células e precipita glicoconjugados) presente no *S. rolfii* se liga ao L-fucosil do *T. harzianum* atuando na etapa do reconhecimento (BARAK et al., 1985; SIVAN e CHET, 1992). Ou seja, os hiperparasitas “atacam” hifas, estruturas de resistência e de reprodução dos fitopatógenos. Em relação à degradação e lise celular da célula hospedeira, ocorre uma desorganização da parede celular pela ação de enzimas, desequilíbrio osmótico, agregação

e retração do citoplasma e da membrana sendo que o efeito das enzimas seria gradual e constante durante todo o processo de micoparasitismo (BENHAMOU e CHET, 1996). Devido a esses mecanismos, o *Trichoderma* apresenta um grande potencial em controle biológico, além do que determinadas espécies desse fungo são resistentes a grandes doses de pesticidas (MUNNECKE et al., 1973, CHET, 1987; BENITEZ, 2004), levando a potenciação de baixas doses de pesticidas no cultivo, pela associação com o biocontrole, garantindo assim, redução dos efeitos de degradação do meio ambiente pela agricultura moderna.

O fungo *S. rolfsii* caracteriza-se pela produção de micélio vigoroso e grampos de conexão nas hifas. Produz escleródios globosos, pequenos, medindo de 0,5 a 1,5 mm de diâmetro. Os escleródios podem sobreviver no solo por, no mínimo, um ano. A fase teleomórfica corresponde ao basidiomiceto *Athelia rolfsii* (Cruzi) Tu e Kimbrough, mas este é raramente observado. A sobrevivência ocorre através do crescimento do micélio em matéria orgânica e pelos escleródios presentes no solo. Água de irrigação, implementos agrícolas, esterco e sementes podem disseminar o fungo. Os escleródios germinam entre 10 °C a 35 °C, mas as condições ideais para o desenvolvimento da doença são alta umidade e temperaturas ao redor de 30 °C, ou seja, ótima adaptação em clima tropical e subtropical. A germinação dos escleródios diminui com o aumento da profundidade no solo. Antes de atuar como patógeno o fungo necessita crescer saprofiticamente sobre substrato orgânico. O fungo *S. rolfsii* é favorecido por fermentos no hospedeiro, mas pode invadi-lo por penetração direta, geralmente, próximo à superfície do solo. Segundo Punja (1985) e El-Katatny et al. (2001), há grandes perdas quando o solo está infestado por esse patógeno.

Em pelo menos nove países já existem formulações comerciais de fungos do gênero *Trichoderma* (WHIPS, 1992), uma vez que, os fungos desse gênero são considerados de grande potencialidade contra vários de fungos fitopatogênicos, e visto que certas espécies de *Trichoderma* são resistentes a altas doses de pesticidas, tais como, o brometo de metila e o pentacloronitrobenzeno (PCNB) (MUNNECKE et al., 1973; CHET, 1987; MARTINS-CORDER e MELO, 1998). Além disso, caracterizam-se pela produção de metabólitos voláteis e não voláteis (DENNIS e WEBSTER, 1971a, b; MARTINS-CORDER e MELO, 1998), atuam por hiperparasitismo (BARNETT, 1963; CHET e ELAD, 1983; BARAK et al., 1985; PAPAVIDAS, 1985; MARTINS-CORDER e MELO, 1998) e pela competição de nutrientes, espaço e oxigênio (CHET e ELAD, 1983; MARTINS-CORDER e MELO, 1998). Os metabólitos tóxicos produzidos por espécies de *Trichoderma* foram primeiramente observados por Weindling (1932), que determinou haver difusão do princípio letal em hifas jovens. Os pesquisadores Elad et al. (1982), Papavizas (1985), Ridout et al. (1988) e El-Katatny (2001) verificaram que as espécies de *Trichoderma* também produzem exoglucanases e endoglucanases, celobiasas e quitinases, que são enzimas importantes na

degradação e na lise da parede celular de fungos fitopatogênicos. A capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie e seus mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente durante o processo de vida do antagonista.

Em virtude do exposto, as estratégias de controle biológico são altamente compatíveis com as práticas de agricultura auto-sustentáveis que são necessárias para a conservação dos recursos naturais para a agricultura (SIVAN e CHET, 1992). Por estas razões, o controle biológico tem se desenvolvido como uma estratégia viável e promissora para a redução de doenças em plantas, tanto usado individualmente como em combinação com outras medidas fitossanitárias (JACK et al., 1991).

Este trabalho foi conduzido com os objetivos de verificar o potencial de isolados de *Trichoderma* para o controle da podridão do colo e tombamento de plântulas do feijoeiro causadas pelo fitopatógeno *S. rolfsii*, caracterizar fisiologicamente linhagens do antagonista usando os critérios de resistência a fungicida, produção de conídios em meio de cultura e observar a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas envolvidas no micoparasitismo por dois isolados de *Trichoderma*.

MATERIAL E MÉTODO

1 - Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle de *S. rolfsii* em feijoeiro (*P. vulgaris*)

Avaliou-se o potencial de 46 isolados de *Trichoderma* para o controle da podridão do colo e tombamento de plântulas do feijoeiro, todos pertencentes à coleção de fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Tabela 1). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, onde a temperatura foi mantida entre 15 °C e 35 °C e a umidade relativa, em torno de 70 %. Utilizaram-se vasos plásticos com capacidade de 3 kg contendo solo constituído da mistura de terra de barranco, areia lavada de rio e esterco, corrigido o pH e autoclavado. O inóculo do patógeno, assim como do antagonista, foi produzido em grãos de arroz parboilizado previamente umedecido com água destilada (60 % p/v) e autoclavado a 120 °C por 20 min. Dois discos de micélio de cada isolado de *Trichoderma*, medindo 0,4 cm de diâmetro, foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo, cada um, 75 g de arroz.

Para *S. rolfsii*, o cultivo ocorreu em bandejas de alumínio de dimensão 44 cm x 30 cm com 500 g de arroz, recebendo cinco discos de micélio cada uma. Os Erlenmeyers e as bandejas permaneceram sete dias em câmara de crescimento a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. As inoculações do solo foram realizadas simultaneamente, com o antagonista e com o patógeno. Após 24 h, procedeu-se à semeadura, utilizando-se 10 sementes de feijão por vaso. O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento.

As avaliações de isolados de *Trichoderma spp.* no controle de *S. rolfsii* em feijoeiro foram realizadas aos 15 e 30 dias após a semeadura, determinando-se as porcentagens de

plantas vivas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Tabela 1 — Isolados de *Trichoderma* que fazem parte da coleção de fungos da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia usados nos experimentos de controle ao fitopatógeno *S. rolfsii*.

Isolado	Espécie	Isolado	Espécie
CEN 144	<i>T. paceramosum</i>	CEN 228	<i>T. koningii</i>
CEN 151	<i>T. harzianum</i>	CEN 229	<i>T. fertile</i>
CEN 162	<i>T. asperellum</i>	CEN 230	<i>T. harzianum</i>
CEN 168	<i>T. harzianum</i>	CEN 231	<i>T. spirale</i>
CEN 195	<i>T. harzianum</i>	CEN 232	<i>T. fertile</i>
CEN 198	<i>T. aureoviride</i>	CEN 234	<i>T. harzianum</i>
CEN 199	<i>T. aureoviride</i>	CEN 235	<i>T. harzianum</i>
CEN 200	<i>T. aureoviride</i>	CEN 236	<i>T. harzianum</i>
CEN 201	<i>T. asperellum</i>	CEN 237	<i>T. harzianum</i>
CEN 203	<i>T. aureoviride</i>	CEN 238	<i>T. harzianum</i>
CEN 204	<i>T. viride</i>	CEN 240	<i>T. harzianum</i>
CEN 206	<i>T. aureoviride</i>	CEN 241	<i>T. harzianum</i>
CEN 208	<i>T. konongii</i>	CEN 243	<i>T. harzianum</i>
CEN 209	<i>T. pseudokoningii</i>	CEN 246	<i>T. harzianum</i>
CEN 211	<i>T. fertile</i>	CEN 247	<i>T. harzianum</i>
CEN 219	<i>T. atroviride</i>	CEN 254	<i>T. harzianum</i>
CEN 220	<i>T. harzianum</i>	CEN 255	<i>T. harzianum</i>
CEN 221	<i>T. viride</i>	CEN 256	<i>T. aureoviride</i>
CEN 222	<i>T. aureoviride</i>	CEN 260	<i>T. viride</i>
CEN 223	<i>T. harzianum</i>	CEN 262	<i>T. harzianum</i>
CEN 225	<i>T. spirale</i>	CEN 266	<i>T. crassum</i>
CEN 226	<i>T. fasciculatum</i>	CEN 400	Não identificado
CEN 227	<i>T. fasciculatum</i>	CEN 405	Não identificado

2 – Caracterização de isolados de *Trichoderma* spp. quanto à capacidade de esporulação em meio de cultura

Os isolados CEN 201 e CEN 241 foram crescidos em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) a 25 °C por um período de 7 dias. As placas contendo as colônias foram então lavadas com 3 mL de Tween 0,05 % obtendo-se, assim, a suspensão para quantificação dos conídios. Gotas desta suspensão foram distribuídas em câmaras de Neubauer, efetuando-se a contagem em cinco quadrantes

3 – Caracterização de isolados de *Trichoderma* spp. quanto à resistência ao fungicida Benomil

Pequenas amostras de micélio dos dois isolados (CEN 201 e CEN 241) foram colocadas no centro da placa de Petri contendo 25 mL do meio BDA acrescido do fungicida Benomil, nas concentrações de 2 µg.mL⁻¹; 5 µg.mL⁻¹ e 8 µg.mL⁻¹. Medidas de diâmetros das colônias foram tomadas em intervalos de 24 h durante 3 dias (QUEIROZ, 2000).

4 - Caracterização de isolados de *Trichoderma* spp. quanto à produção de enzimas hidrolíticas

Inoculou-se uma alíquota de 1,0x10⁶ conídios.mL⁻¹ de cada isolado em erlenmeyer com 50 mL de meio completo (FeSO₄ 0,50 g.L⁻¹; KCl 0,50 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 1,50 g.L⁻¹; MgSO₄ 7H₂O 0,50 g.L⁻¹; NaNO₃ 6,0 g.L⁻¹; ZnSO₄ 0,001 g.L⁻¹; caseína 1,50 g.L⁻¹; extrato de levedura 0,50 g.L⁻¹; glicose 10,0 g.L⁻¹; peptona 20,0 g.L⁻¹, pH 6,5), de acordo com Pontecorvo (1953), seguindo-se a agitação de 150 rpm por 48 h a 25 °C (New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA). Posteriormente, os meios foram centrifugados duas vezes por 10 min a 10000xg e então transferidos para 50 mL de meio mínimo (MM) ou meio de indução (MgSO₄.H₂O 0,2 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 0,9 g.L⁻¹; KCl 0,2 g.L⁻¹; NH₄NO₃ 1,0 g.L⁻¹; FeSO₄ 0,002 g.L⁻¹; ZnSO₄ 0,002 g.L⁻¹; quitina 5 g.L⁻¹, pH 6,3) e então mantidos a 25 °C a 150 rpm por 48 h. A seguir, os isolados foram filtrados a vácuo através de papel filtro Whatman nº 1 e analisados quanto a presença das enzimas quitinase, N-acetilglicosaminidase, β-glucanase e protease.

5 – Determinações bioquímicas

5.1 - Proteínas totais

A quantidade total de proteína das amostras foi determinada adicionando-se 200 µL do reagente colorimétrico (BRADFORD, 1976) em 100 µL de amostra, completando-se com 700 µL de água destilada. Após 10 min de incubação a temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi determinada a 595 nm. A quantidade de proteína total foi calculada utilizando-se uma curva padrão construída com quantidades crescentes de BSA (albumina sérica bovina, Sigma CO.) na faixa de 0 a 10 µg.

5.2 - Ensaio de quitinase

A atividade quitinolítica foi feita através do método modificado de Molano et al. (1997), incubando-se 1,0 mL de amostra, 500 µL de quitina regenerada (quitina regenerada 0,5 % em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0) e 500 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 por 24 h a 37 °C sob agitação. Após o período de incubação, 1,0 mL do ensaio foi centrifugado por 5 min a 12000xg. A quantificação dos açúcares redutores liberados da quitina foi feita adicionando-se 1,0 mL do reagente DNS (MILLER, 1959) em 250 µL do sobrenadante, seguindo-se aquecimento em banho de água fervente por 10 min e leitura da absorbância a 550 nm. Enzima desnaturada, após incubação em banho de água fervente por 15 min e quitina regenerada dissolvida em água (sem enzima) foram utilizadas como controles. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir uma variação de 0,1 nm por hora.

5.3 – Ensaio de N-acetilglicosaminidase (NAGase)

Para a determinação da atividade de NAGase, utilizou-se uma versão modificada do método de Yabuki et al. (1986), onde 50 µL de amostra foram misturadas em 350 µL de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0 e 100 µL de substrato (5 mM *p*-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0). Após o período de incubação por 1 h a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de Na₂CO₃ 0,25 M seguindo-se a leitura no comprimento de 405 nm. Enzima desnaturada e substrato em água (sem enzima) foram utilizados como controles. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir uma mudança de 0,1 nm na absorbância por hora.

5.4 - Ensaio da protease

A atividade proteolítica foi determinada a partir de modificações do método de Kunitz (1946), pela adição de 500 µL de amostra de substrato (caseína 1 % em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e MgCl₂ 0,1 M) seguindo-se incubação por 1 h a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 100 % durante 1 h a -20 °C. Os tubos foram centrifugados a 12000xg por 5 min sendo a absorbância do sobrenadante determinada a 280 nm. Enzima desnaturada e amostra incubada sem substrato foram utilizadas como controles. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir uma mudança de 0,1 nm na absorbância por hora.

5.5 - Ensaio de β-glucanase

A determinação da atividade de β-glucanase foi realizada segundo modificações do método de Elad et al. (1982) adicionando-se 500 µL de amostra em 250 µL de substrato (laminarina 0,2 % em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0) e incubando-se por 2 h a

37 °C. A quantificação dos açúcares redutores liberados da laminarina foi feita misturando-se 250 µL da reação com 1,0 mL da DNS, seguindo-se de aquecimento em banho de água fervente por 10 min. Enzima desnaturada e substrato sem enzima foram utilizados como controles. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir uma variação de 0,1 nm por hora.

RESULTADOS

1 - Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle de *S. rolfsii* em feijoeiro (*P. vulgaris*)

Quarenta e quatro isolados proporcionaram controle de 60 % a 95 %, sendo que destes, 11 isolados (CEN 144, CEN 168, CEN 201, CEN 209, CEN 211, CEN 221, CEN 222, CEN 225, CEN 227, CEN 256, CEN 266) apresentaram controle igual ou superior a 90 % (Figura 1). Com estes resultados, foi realizada a seleção do isolado com o maior percentual de antagonismo e daquele com os menores índices de controle para se avaliar a produção de conídios, concentração mínima inibitória de fungicida e atividade enzimática, visando determinar o mecanismo de antagonismo utilizado. Desse modo, para estes ensaios utilizaram-se os isolados CEN 201 (*T. asperellum*), com uma taxa de antagonismo de 95 %, e CEN 241 (*T. harzianum*), com 25,5 % de controle.

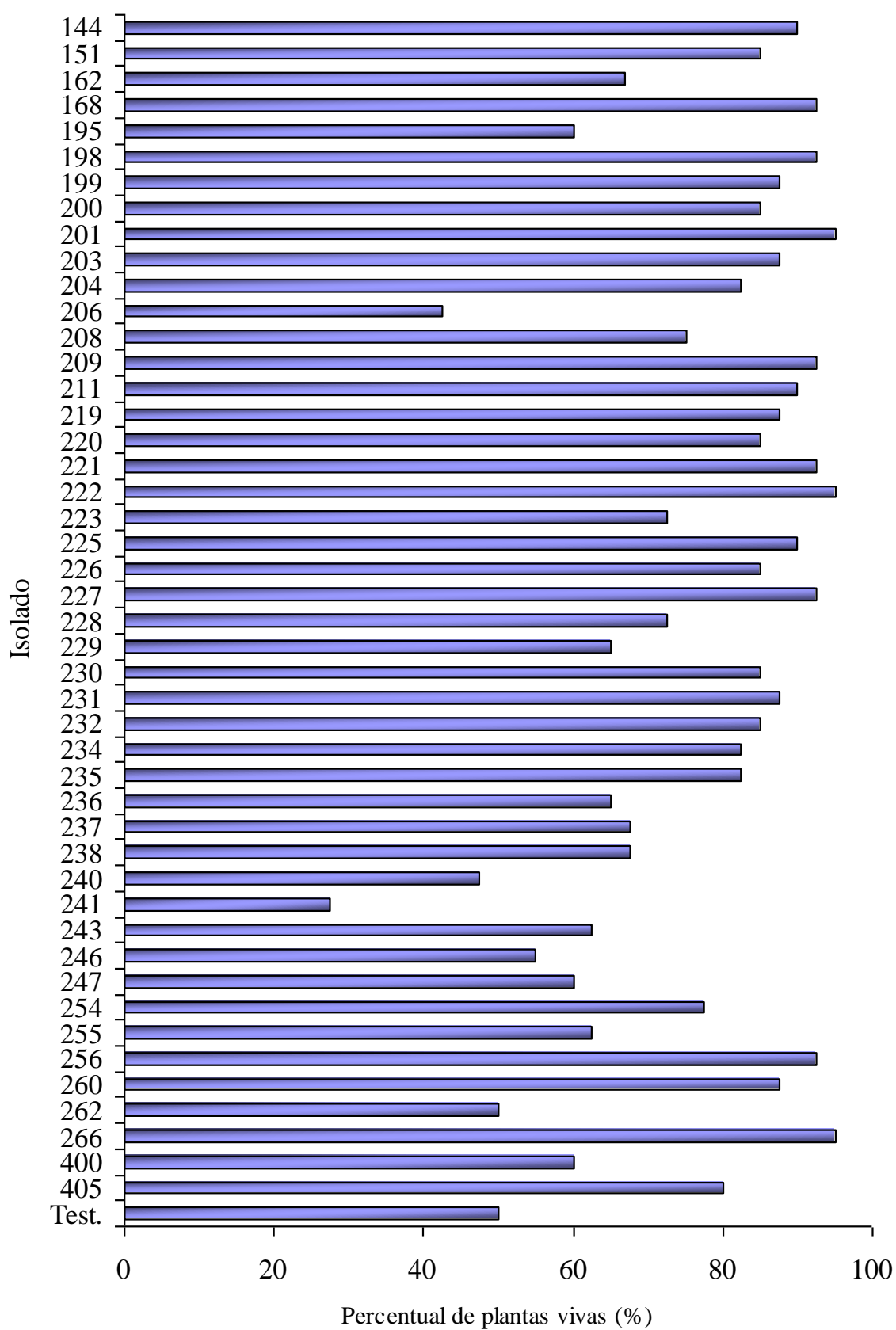


Figura 1 — Porcentagem de plântulas de feijão obtida em solo tratado com *Trichoderma* spp. e inoculado com o patógeno *S. rolfsii*.

2 – Caracterização de isolados de *Trichoderma* spp. quanto à capacidade de esporulação em meio de cultura

No experimento de produção de conídios em meio de cultura BDA, observou-se que os dois isolados selecionados para avaliação apresentaram capacidade de esporulação satisfatória (Tabela 2).

Tabela 2 - Produção de conídios dos isolados de *Trichoderma* crescidos em meio BDA.

Isolados	Produção em BDA
CEN 201	$4,25 \times 10^8$
CEN 241	$8,15 \times 10^8$

O isolado de *Trichoderma* CEN 241 apresentou o equivalente ao dobro na quantidade de conídios produzidos em relação à linhagem CEN 201. Apesar dos fungos do gênero *Trichoderma* spp. caracterizarem-se por um crescimento rápido, há consideráveis variações em seu crescimento e esporulação até mesmo quando são comparados os isolados da mesma espécie (PERES e MELO, 1995).

3- Caracterização de isolados de *Trichoderma* quanto à resistência ao Benomil

Os isolados CEN 201 e CEN 241 foram caracterizados quanto à resistência a diferentes concentrações do fungicida Benomil, onde foram observadas variações nos níveis de resposta ao agente químico testado (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação do crescimento micelial (mm) em meio BDA suplementado com diferentes concentrações de Benomil.

Isolados	Benomil	24 h		48 h		72 h		96 h	
CEN 201	0 µg.mL ⁻¹	2,17 ± 0,14		6,03 ± 0,15		9 ± 0		9 ± 0	
	2 µg.mL ⁻¹	0,77 ± 0,33		1,36 ± 0,43		1,88 ± 0,59		2,6 ± 0,7	
	5 µg.mL ⁻¹	0,40 ± 0,06		0,49 ± 0,09		0,53 ± 0,1		0,62 ± 0,05	
	8 µg.mL ⁻¹	0,4 ± 0,15		0,52 ± 0,17		0,49 ± 0,17		0,46 ± 0,19	
CEN 241		1,33	±	5,64	±	8,97	±		
	0 µg.mL ⁻¹	0,12		0,19		0,06		9 ± 0	
		0,28	±			0,81	±	1,11	±
	2 µg.mL ⁻¹	0,02		0,7 ± 0,07		0,11		0,13	
		0,34	±	0,32	±	0,37	±	0,37	±
	5 µg.mL ⁻¹	0,08		0,08		0,06		0,06	
		0,40	±	0,36	±	0,38	±		
	8 µg.mL ⁻¹	0,06		0,06		0,05		0,4 ± 0,03	

Valores são média ± desvio padrão de três repetições.

A partir da análise dos resultados observou-se que o isolado CEN 201 apresentou uma maior velocidade de crescimento e maior resistência ao fungicida Benomil. Nas culturas usadas como controle, com 72 h de crescimento, os fungos cobriram todo o meio de cultura.

Segundo Davidse (1973) o mecanismo de ação do fungicida Benomil consiste na inibição da mitose em fungos como *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter. Para esse processo ocorrer, o fungicida interage com os microtúbulos presentes no citoplasma (DAVIDSE, 1986). Os microtúbulos estão presentes nas células eucarióticas e são essenciais para uma série de atividades celulares, tais como: formação do fuso e movimento dos cromossomos na mitose; processos de secreção; manutenção da forma e do movimento celular (GULL, 1981). O microtúbulo é um heterodímero composto de duas subunidades polipeptídicas denominadas α -tubulina e β -tubulina (THOMAS et al., 1985). Apesar da atividade biológica do benomil estar baseada na interferência com a formação e funcionamento dos microtúbulos que estão presentes nas células eucarióticas (HOWARD e AIST, 1980), muitos eucariotos não são igualmente sensíveis aos benzimidazóis, como é o caso dos fungos, que apresentam diferenças no grau de sensibilidade a estas drogas (BOLLEN e

FUCHS, 1970; DAVIDSE, 1986). Sendo assim, o nível variado de resistência ao benomil das linhagens de *Trichoderma* utilizadas neste estudo, pode ser devido às diferenças na capacidade de ligação do fungicida com a β -tubulina dos fungos em questão (QUEIROZ, 2000).

4. Caracterização de isolados de *Trichoderma* spp. quanto à produção de enzimas hidrolíticas

A análise do conteúdo de proteínas presentes no meio de indução contendo quitina como única fonte de carbono indicou que a linhagem CEN 241 produziu $6,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína secretada e o CEN 201 apresentou uma concentração extremamente baixa, ficando abaixo de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

No tocante à atividade enzimática, os dois isolados de *Trichoderma* CEN 201 e CEN 241 apresentaram diferenças na produção dos quatro sistemas enzimáticos escolhidos para estudo (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação da atividade enzimática (U) das principais enzimas envolvidas no micoparasitismo produzidas pelos isolados CEN 201 e CEN 241 de *Trichoderma*.

Isolado	Quitinase	NAGase*	β -glucanase	Protease
CEN 201	$0,115 \pm 0,452$	$0,09 \pm 0,004$	$0,727 \pm 0,010$	$0,307 \pm 0,127$
CEN 241	$0,436 \pm 0,018$	$1,71 \pm 0,032$	$0,542 \pm 0,011$	$0,075 \pm 0,004$

*NAGase – N-Acetilglicosaminidase.

Com relação à produção de quitinase, o isolado CEN 241 apresentou atividade 3,8 vezes maior que CEN 201. Foi observado que o isolado CEN 201 obteve uma atividade proteolítica 4 vezes maior que CEN 241. Para a atividade de N-acetilglicosaminidase, CEN 241 apresentou uma atividade 19 vezes maior que CEN 201. No ensaio de β -glucanase, CEN 201 foi 1,3 vezes maior em atividade enzimática do que CEN 241. Observou-se elevada produção de quitinase e N-acetilglicosaminidase a partir do isolado CEN 241 (Figura 2).

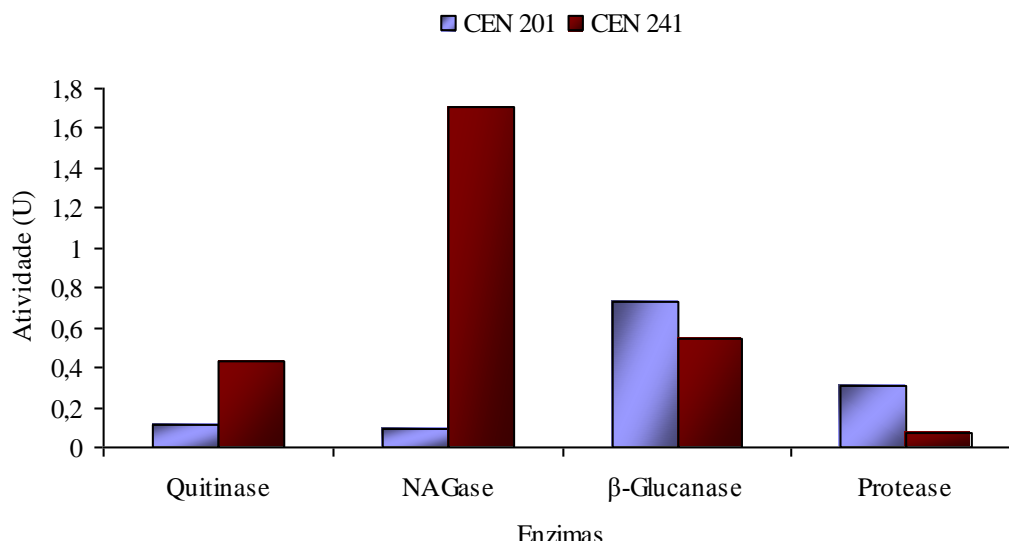


Figura 2 – Comparação entre as atividades das principais enzimas envolvidas no micoparasitismo por dois isolados de *Trichoderma* quando crescidos em meio mínimo suplementado com quitina como fonte de carbono.

O mecanismo de modos de ação antagonista de *Trichoderma* envolve o quimiotropismo, reconhecimento mediado por lectina e formação de estruturas de penetração. Este processo é potencializado pela secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares, tais como, quitinases, β -glucanases e proteases com capacidade de degradar componentes da parede celular do fitopatógeno, facilitando a entrada do composto de interesse (GOLDMAN et al., 1994; LORITO et al., 1996). Em *T. harzianum*, as enzimas quitinolíticas e β -1,3-glucanases têm sido consideradas como os principais fatores responsáveis pelo processo de controle (ELAD et al., 1984). Enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas por *T. harzianum* atuam sinergisticamente *in vitro*. Quitinases e β -glucanases- de *Trichoderma* podem não só atuar sinergisticamente entre si, como também com enzimas hidrolíticas de outros organismos, por exemplo, *Enterobacter cloacae*, e com compostos fungitóxicos (QUEIROZ, 2000).

Conforme a constatação de Lima et al. (1999), a enzima com atividade quitinolítica capaz de hidrolisar a parede de *S. rolfii* era uma endoquitinase produzida por uma linhagem de *T. harzianum*. Então, a partir da seqüência de experimentos realizados, obteve-se uma correlação entre a atividade de micoparasitismo por *Trichoderma*.

Em função dos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se verificar que o antagonista que apresentou o maior percentual de controle em plantas de feijão, CEN 201, não foi aquele que apresentou a maior atividade quitinolítica. Essa linhagem mostrou-se menos sensível ao fungicida Benomil, indicando uma possível coexistência entre esse fungo e determinadas substâncias presentes no ambiente. Esse é um critério que deverá ser

estudado em futuros experimentos para se adequar as melhores condições de uso do isolado CEN 201 quando na aplicação no manejo integrado de pragas. Os resultados obtidos indicam a importância de maiores estudos a respeito das espécies de *Trichoderma* visando a possibilidade de se introduzir este fungo na agricultura como um agente de controle biológico, buscando-se os melhores resultados na contenção da praga e na redução de danos ao meio ambiente quando são utilizados produtos químicos. Na literatura e até mesmo em produtos de biocontrole já em comercialização, bons resultados são apresentados com a utilização de *T. harzianum*. Este trabalho evidencia o potencial de isolados pertencentes a outras espécies do gênero *Trichoderma* para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

CONCLUSÕES

1. O isolado CEN 201 foi o que apresentou maior potencial como agente de biocontrole contra *S. rolfsii* dentre os testados.
2. Esta capacidade de antagonismo não correspondeu a uma maior capacidade de esporulação em meio BDA e uma maior produção das enzimas quitinase e N-acetilglicosaminidase.
3. Os resultados deste trabalho indicaram ausência de correlação entre potencial antagonico e atividade enzimática em filtrado de cultura, sugerindo que o micoparasitismo não seja o mecanismo preferencial de ação de *Trichoderma* sobre *S. rolfsii*.
4. Estes resultados também apontaram a inexistência de correlação direta entre o nível de produção de enzimas do sistema quitinolítico e o potencial de biocontrole. Entretanto, devido à grande diversidade de interações antagonistas, esse importante critério não deve ser totalmente descartado na triagem e seleção de potenciais isolados de *Trichoderma*.

REFERÊNCIAS

- BARAK, R.; ELAD, Y.; MICRELMAN, O.; CHET, I. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 15, p. 458-462, 1985.
- BARNETT, H. L. The nature of mycoparasitism by fungi. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, US, v. 17, p. 1-14, 1963.
- BECKER, J. O.; SCHWINN, F. J. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. **Pesticide Science**, Oxford, GB, v. 37, p. 355-363, 1993.

BENHAMOU, N.; CHET, I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 86, p. 405-416, 1996.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMON, M. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BOLLEN, G. J.; FUCHS, A. On the specificity of the in vitro and in vivo antifungal activity of benomyl. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 76, p. 299-305, 1970.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHET, I. *Trichoderma*: application, mode of action and potential as biocontrol agents of soilborne plant pathogenic fungi. In: CHET, I. (Ed.). **Inovative approaches to plant disease control**. New York: Wiley, 1987. p. 137-160.

CHET, I. Microbial control of plant diseases. In: ENVIRONMENTAL Microbiology. New York: Wley-Liss, 1992. p. 335-354.

CHET, I.; ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. Les antagonismes microbiens. Mode d'action et application à la lutte biologique controle les maladies des plantes. **Colloques de L'I.N.R.A.**, n. 18, p. 35-40, 1983.

DAVIDSE, L. C. Antimitotic activity of methylbenzimidazol-2-yl carbamate in *Aspergillus nidulans*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 3, p. 317-321, 1973.

DAVIDSE, L. C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, US, v. 24, p. 43-65, 1986.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Production of non-volatile antibiotics. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. **Transactions / British Mycological Society**, Cambridge, GB, v. 57, p. 25-39, 1971a.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Production of volatile antibiotics. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. **Transactions / British Mycological Society**, Cambridge, GB, v. 57, p. 41-48, 1971b.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III - Hyphal interaction. **Transactions / British Mycological Society**, Cambridge, GB, v. 57, p. 368-369, 1971c.

EL-KATATNY, M. H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K. H.; ELNAGHY, M. A.; GÜIBITZ, G. M. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 137-143, 2001.

ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, US, v. 16, p. 381-386, 1984.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 28, p. 719-725, 1982.

FRITZ, G. **Micoparasitismo de espécies de *Pythium* com oogônio equinulado e o controle de *Pythium ultimum* Trow causador de tombamento de mudas, em hortaliças.** 1996. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

GOLDMAN, G. H.; HAYES, C.; HARMAN, G. E. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 12, p. 478-482, 1994.

GULL, K. Microtubules and microtubule proteins in fungi. In: GULL, K.; OLIVER, S. G. **The fungal nucleus**. Cambridge: [s.n.], 1981. p. 113-132.

HOWARD, R. J.; AIST, J. R. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: Ultrastructural effects of methyl benzimidazol-2-yl carbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cells. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 87, p. 55-64, 1980.

INBAR, J.; CHET, I. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, p. 1055-1059, 1992.

INBAR, J.; CHET, I. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and its role in mycoparasitism. **Microbiology**, Reading, GB, v. 140, p. 651-657, 1994.

JACK, A.; LEWIS ; PAPAVIDAS, G. C. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. **Crop Protection**, Guildford, GB, n. 10, p. 95-105, 1991.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **Journal of Genetics and Physiology**, v. 29, p. 149-154, 1946.

LIMA, L. H. C. **Produção de enzimas hidrolíticas por isolados de *Trichoderma* Sp. e caracterização molecular e hidrolítica de uma quitinase purificada.** 1997. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

LIMA, L. H. C.; DE MARCO, J. L.; ULHOA, C. J.; FELIX, C. R. Synthesis of a *Trichoderma* chitinase which affects the *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **Folia Microbiologica**, Praha, CS, v. 44, p. 45-49, 1999.

LORITO, M.; MACH, R. L.; SPOSATO, P.; STRAUSS, J.; PETERBAUER, C. K.; KUBICEK, C. P. Mycoparasitic interaction relieves binding of Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 14868-14872, 1996.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, SP, v. 55, p. 1-7, 1998.

MELO, I. S. Potencialidades da utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 1991. p. 135-156.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOLANO, J.; DURAM, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using triated chitin. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 83, p. 648-656, 1977.

MUNECKE, D. E.; KOLBEZEN, M. J.; WILBUR, W. D. Effect of methyl bromide or carbon disulfide on *Armillaria* and *Trichoderma* growing on agar medium and relations to survival of

Armillaria in soil following fumigation. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 63, p. 1352-1357, 1973.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, US, v. 23, p. 23-54, 1985.

PEREIRA, J. C. R.; CHAVES, G. M.; ZAMBOLIM, L.; MATSUOKA, K.; SILVA-ACUNA, R.; VALE, F. X. R. Controle integrado de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, n. 21, p. 254-260, 1996.

PERES, E.; MELO, I. S. Variability among *Trichoderma harzianum* isolates: I - Cytological aspects. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, SP, v. 52, p. 56-59, 1995.

PONTECORVO, G. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advanced Genetics**, v. 5, p. 101-238, 1953.

PUNJA, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, US, v. 23, p. 97-127, 1985.

QUEIROZ, P. R. **Transformação de *Trichoderma harzianum* com genes de egfp e β -tubulina**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

REIS, E. M.; FORCELINI, C. A.; REIS, A. C. **Manual de fungicidas**: guia para o controle químico de doenças de plantas. 4. ed. Florianópolis: Editora Insular, 2001. p. 16-17.

RIDOUT, C. J.; COLEY-SMITH, J. R.; LYNCH, J. M. Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 10, p. 180-187, 1988.

SCHIPPER, B.; LUGTENBERG, B.; WEISBEEK, P. J. Plant growth control by fluorescent pseudomonas. In: **INNOVATIVE Approaches to Plant Disease Control**. New York: Wiley & Sons, 1987. p. 19-39.

SIVAN, A.; CHET, I. **Environmental microbiology**: microbial control of plant diseases. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 335-354.

THOMAS, J. H.; NEFF, N.; BOTSTEIN, D. Isolation and characterization of mutations in the β -tubulin gene of *Sccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Austin, US, v. 112, p. 715-734, 1985.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 22, p. 837-845, 1932.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, US, v. 26, p. 379-407, 1988.

WHIPS, J. M. Status of biological disease control in horticulture. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, GB, v. 2, p. 3-24, 1992.

YABUKI, M.; MIZUSHIMA, K.; AMATATOU, T.; ANDO, A.; FUJI, I.; SHIMADA, M.; YAMASHIDA, M. Purification and characterization of chitinase and a chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp *anaerogenes* A52. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 32, p. 25-32, 1986.

YOKOYAMA, L. P. **Cultivo do feijoeiro comum**. Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm>>. Acesso em: 12 abr. 2006.